合成 8 二甲基异戊烯基柚皮素的人工酿酒酵母菌株构建

李博，梁楠，刘夺，刘宏，王颖，肖文海，姚明东**，元英进

（[1]天津大学系统生物工程教育部重点实验室，天津，300072）

（[2]天津化学化工协同创新中心合成生物学平台，天津，300072）

摘要：8 二甲基异戊烯基柚皮素（8DN）作为生产黄酮类类药物淫羊藿苷的重要前体,在医药合成领域具有重大应用潜力。由于其合成路径及相关基因的复杂性，目前主要通过饲喂 8DN 的直接前体(柚皮素，异黄腐酚等）的方式合成 8DN，而在生物体内全合成 8DN 的的研究工作还未见报道。为了实现 8DN 在酿酒酵母体内的生物全合成，该研究通过组合筛选 8DN 前体物柚皮素合成所需的多种外源基因（*TAL*，*4CL*，*CHS*，*CHI*），获得 30 株柚皮素生产菌，发现不同来源的基因组合引起柚皮素产量的明显差异（0.37mg/L-22.33mg/L）。并且利用 Delta 位点将较优的基因组合整合至酵母基因组，实现了稳定的柚皮素高产菌株（SyBE_Sc02050031）构建。在此基础上进一步导入带有苦参来源的异戊烯基转移酶基因（*N8DT*）多拷贝质粒，实现 8DN 合成的完整反应过程，8DN 的摇瓶发酵产量达到 36.7μg/L。另外通过关键限速酶 N8DT 的序列优化策略，发现截断定位信号肽序列的 N8DT 明显提高了从柚皮素到 8DN 这一关键反应的催化效果，8DN 的产量提高到 52.6 μg/L（144.2%）。该研究首次在酿酒酵母中成功构建高产 8DN 的生物全合成路径，为在微生物体内合成其他黄酮类天然产物提供了参考，具有重要的指导意义。

关键词：8 二甲基异戊烯基柚皮素 合成生物学 酿酒酵母 异源表达 蛋白截断

基金项目：国家自然科学基金(31600052)。

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(31600052)

**通讯作者：姚明东，电子邮箱：yao.1982@163.com

Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of 8-dimenthylally naringenin

LI Bo, LIANG Nan, LIU Duo, LIU Hong, WANG Ying, XIAO Wen-hai, YAO Ming-Dong**, YUAN Ying-Jin

([1] Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), Tianjin University, Tianjin, China)

([2] SynBio Research Platform, Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering, Tianjin, China)

Abstract: 8-dimenthylallynaringenin(8DN) is the important precursor for the flavonoids medicine Icaritin, which has wide applications in pharmaceutical area. Due to the complexity of its biosynthetic pathway and related genes, main attentions were paied to biotransfering by procursor (like naringenin or isoxanthohumol) feeding. To date, no report about de novo biosynthesis of 8DN has been uncovered. In present study, In order to realize 8DN production in *Saccharomyces cerevisiae,* four key genes involved in naringenin biosynthesis, *TAL， 4CL， CHS and CHI* from different species, were combinatorially screened, obtaining 30 naringenin producing strains, in which significant production variation ranged from 0.37mg/L to 22.34mg/L. Furthermore, the best combination of *TAL，4CL，CHS and CHI* genes were integrated into chromosome for better genetic stability by Delta integration, generating strain SyBE_Sc02050031. Subsequently, prenyltransferase gene (*N8DT*) from *Sophora flavescens* incorporated with multicopy plasmid was introduced into SyBE_Sc02050031 (gaining strain SyBE_Sc02050032) and a titer of 8DN at 36.7μg/L in shaking flask was observed accordingly, indicating de novo biosynthesis of 8DN in yeast was successfully achieved. In addition, truncation tailoring strategy was explored to improve the catalysis function of N8DT, leading to 8DN production (up to 52.6 μg/L) increasing by 44% compared to that in strain SyBE_Sc02050032. This study firstly accomplished de novo biosynthesis of 8DN in microbes, which provides a good reference for microbial production of other natural flavonoids.

Key words: 8-dimenthylally naringenin   synthetic biology   *Saccharomyces cerevisiae*   heterologous expression   protein truncation

引言

黄酮类化合物通常作为植物的防卫元素，在植物抵御外来因素侵扰过程中发挥重要作用。鉴于该类物质具有抗菌、抗炎、抗癌、解痉和利胆等功效，因此在人类疾病研究和药理研究中具有重要应用价值[1-4]。其中，8 二甲基异戊烯基柚皮素（8DN）作为代表的黄酮类产物，不仅具有药理研究价值，同时还是淫羊藿素等药物合成的重要前体，越来越被人们广泛关注和研究[5-7]。

8DN 的合成方法目前主要分为化学合成法和生物合成法，其中化学合成法是以间苯三酚为原料与苄氧乙腈发生酰化反应，再经过羟醛缩合以及多步的脱羟保护反应，最终得到产物[8-10]。该方法的局限性在于环境污染严重，生产效率低。目前 8DN 的生物合成法，受限于合成路径及相关基因的复杂性，主要通过饲喂 8DN 直接前体的方式来实现[11]。目前日本学者 Yazaki 等[12] 利用 8DN 合成酶 N8DT 通过柚皮素细胞饲喂的方式获得了 8DN，产量达 20.2μg/g。而浙江大学傅明亮等[13,14]通过饲喂异黄腐酚，在脱甲基酶的作用下合成了 8DN，产物转化率达到 6.62%。该方法一定程度上避免了化学合成中多步反应的低效率和环境污染的问题[15-18]，但存在着饲喂原料成本昂贵，可利用率低等问题，限制了其工业应用价值和生物合成路径的可操作性。

针对上述情况，本研究利用合成生物学思想和技术[19,20]，拟在安全模式微生物酿酒酵母中[21-24]，优化组合 8DN 合成的关键外源基因，构建生产 8DN 的完整合成途径。鉴于 8DN 合成路径及相关基因的复杂性，我们首先通过引入不同来源的柚皮素代谢路径基因 *TAL*，*4CL*，*CHS* 和 *CHI*，在酿酒酵母体内构建一条 8DN 前体物柚皮素的合成路径，利用多基因组合优化筛选出柚皮素高产菌株，并进一步借助 Delta 位点整合的方式将高产菌的基因线路组合转移到酵母基因组中[25]，从而获得稳定的柚皮素高产底盘菌。在此基础上导入最后一个关键酶基因模块—异戊烯基转移酶基因 *N8DT*[26]，初步实现 8DN 在酿酒酵母中的生物全合成（图 1）。此外我们针对关键酶 N8DT 的低活性问题，通过蛋白二级结构的分析，提出了蛋白结构优化方案，对蛋白的两组特定结构序列进行截断：1. 定位信号肽区域（1-40AA）；2. disorder 区域（1-84AA）。实验结果显示，截断后 N8DT 的活性都反映出正向效果，其中定位信号肽区域截断后的 N8DT 蛋白具有更好的催化效果，促使 8DN 的产量进一步提高了 44.2%，摇瓶产量高达 52.6μg/L。

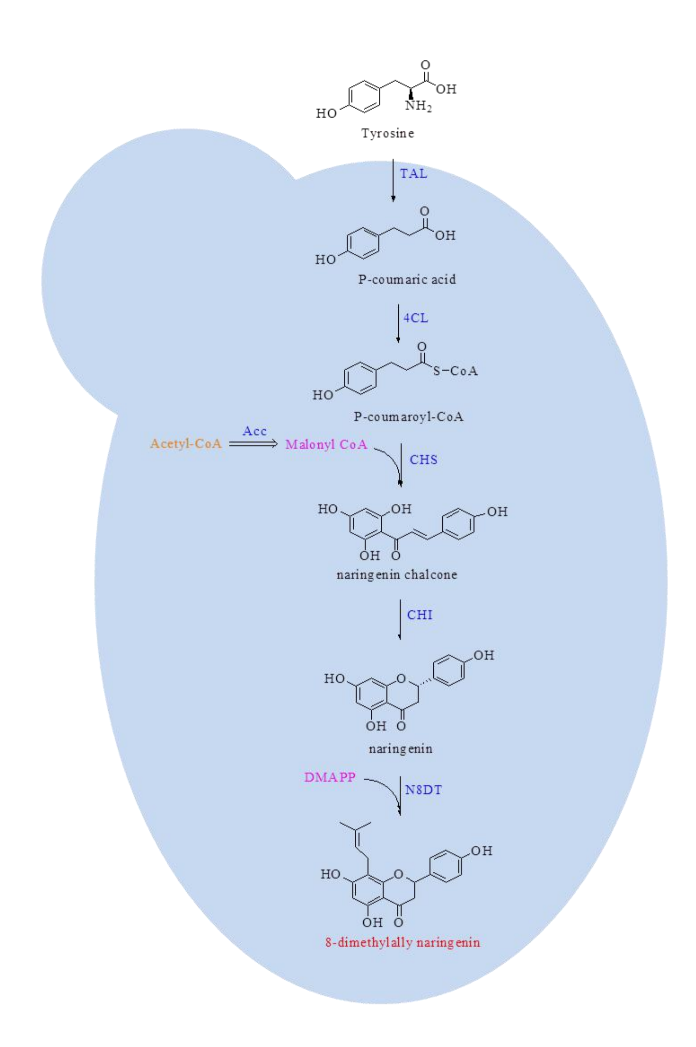


图 1 酿酒酵母体内 8 二甲基异戊烯基柚皮素合成路径的构建。 在该合成路径中引入 5 种外源基因 *TAL, 4CL , CHS, CHI* 和 *N8DT* (丙二酰辅酶 A 和 DMAPP 为酵母的内源代谢产物)。

Fig. 1 Construction of 8-dimenthylally naringenin pathway in S.cerevisiae. The five exogenous genes *TAL, 4CL , CHS, CHI* and *N8DT* were introduced in the pathway (Malonyl-CoA and DMAPP are the products of endogenous metabolism).

1. 材料与方法

1.1 工具酶与试剂

大肠杆菌感受态细胞 DH5α 购自 Biomed 公司，TransStart FastPfu 高保真 DNA 聚合酶购自 TransGen 公司；T4 DNA 连接酶；限制性内切酶 *Bsa* I-HF、 *Not* I-HF、*Sac* I-HF 和 *Sal* I-HF 购自 NEB 公司；质粒小提试剂盒、普通 DNA 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根公司；柚皮素和 8 二甲基异戊烯基柚皮素标品购自上海源叶生物有限公司；甲醇、乙腈和二氯甲烷购自 Fisher 公司；丙酮购自天津市元立化工有限公司；二甲基亚砜（DMSO）、PEG3350、鲑鱼精 DNA、各类氨基酸粉末购自鼎国昌盛公司；乙酸锂购自北方天医化学试

剂厂；去氨基酸酵母氮源（YNB）购自 Genview 公司。

1.2 菌株、质粒和培养基

宿主菌 E. coli DH5α {endA1; hsdR17; gyrA96;thi-1; relA1; supE44; recA1; ΔlacU169(ϕ80lac ΔZM15)} 和酿酒酵母菌株CENpK2-1d（MATa，his3Δ1，leu2Δ0，trp3Δ0，ura3Δ0）购自Euroscarf 公司，酵母表达载体质粒 pRS425K 为本实验室构建，详见表1。

LB 培养基（10 g/L氯化钠；10 g/L 胰蛋白胨；5 g/L 酵母提取物；固体培养基添加1.5%琼脂粉）用于大肠杆菌的培养；YPD 培养基(40 g/L 葡萄糖；20 g/L 胰蛋白胨；10 g/L 酵母提取物；固体培养基添加2%琼脂粉）用于酿酒酵母的培养；SC四缺培养基（20 g/L葡萄糖；6.7 g/LYNB；2 g/Ldrop-out的氨基酸混合物；固体培养基添加2% 琼脂粉）；SC-leu 培养基（20 g/L葡萄糖；6.7 g/LYNB；2 g/Ldrop-out去除异亮氨酸的氨基酸混合物；固体培养基添加2% 琼脂粉）和SC-ura培养基(20 g/L 葡萄糖；6.7 g/LYNB；2 g/Ldrop-out去除尿嘧啶的氨基酸混合物；固体培养基添加2% 琼脂粉)用于酵母转化子筛选和培养。

1.3 酿酒酵母表达载体的构建和基因组模块整合与筛选

基因表达载体模块的构建如图 2(a)和 2(b)所示。以 BY4741 基因组 DNA 为模板，通过特异性引物 PCR 扩增 CYC1、GPM1、GPD、FBA1、PGK1 和 ENO2 终止子，PGK1、PGI1、TPI1、HXT7 和 PDC 启动子，L-arm（*Pst* I 酶切位点上游 250 bp)，R-arm（*Bsa* I 终止密码子下游 254 bp）和 ura3 ORF 框；通过 OE-PCR 扩增得到 delta1-URA3-T_{GPM} 片段并以 *Pst* I 和 *BamH* I 酶切连接到 pRS425K，命名为 Module1；通过 OE-PCR 扩增得到 T_{GPM1}-P_{PGK1}-T_{GPD1} 片段并以 *Pst* I 和 *BamH* I 酶切连接到 pRS425K，命名为 Module2；将 *TAL* 基因以 *Bsa* I 酶切连接到 Module2 中，命名为 Module3；将 T_{GPM1}-P_{PGK1}-*TAL*-T_{GPD1} 片段 *Not* I 酶切连入 pRS415 中，命名为 Module4；相同的，通过 OE-PCR 扩增得到 T_{GPD1}-P_{PGI1}-T_{FBA1} 片段并以 *Pst* I 和 *BamH* I 酶切连接到 pRS425K，命名为 Module5；将 *4CL* 以 Bsa I 酶切连接到 Module5 中，命名为 Module6；将 T_{GPD1}-P_{PGI1}-*4CL*-T_{FBA1} 片段 Not I 酶切连入 pRS423 中，命名为 Module7；通过 OE-PCR 扩增得到 T_{FBA1}-P_{TPI1}-T_{PGK1} 片段并以 *Pst* I 和

BamH I 酶切连接到 pRS425K，命名为 Module8；将 *CHS* 基因以 Bsa I 酶切连接到 Module8 中，命名为 Module9；将 T_{FBA1}-P_{TPI1}-*CHS*-T_{PGK1} 片段 *Not* I 酶切连入 pRS414 中，命名为 Module10；通过 OE-PCR 扩增得到 T_{PGK1}- P_{HXT7}-T_{CYC1} 片段并以 *Pst* I 和 *BamH* I 酶切连接到 pRS425K，命名为 Module11；将 *CHI* 基因以 *Bsa* I 酶切连接到 Module11 中，命名为 Module12；将 T_{PGK1}-P_{HXT7}-*CHI*-T_{CYC1} 片段 *Not* I 酶切连入 pRS416 中，命名为 Module13；通过 OE-PCR 扩增得到 T_{PGK1}-delta2 片段并以 *Pst* I 和 *BamH* I 酶切连接到 pRS425K，命名为 Module14；通过 OE-PCR 扩增得到 T_{ENO2}-P_{PDC1}-T_{GPM1} 片段并以 *Pst* I 和 *BamH* I 酶切连接到 pRS425K，命名为 Module15；将 *N8DT* 基因以 *Bsa* I 酶切连接到 Module15 中，命名为 Module16(见表 2)。

利用包含 4 种外源基因（*TAL*，*4CL*，*CHS* 和 *CHI*）的模块 Module4、Module7、Module10 和 Module13 采用醋酸锂转化法转化酿酒酵母菌株 CENpK2-1D，先构建出一系列柚皮素生产菌。并通过 SC 四缺固体培养基筛选单菌落，在 SC 四缺液体培养基中培养，30℃、200 rpm 培养至 OD_{600} 约为 4，存甘油菌。这些柚皮素生产菌的分别命名为 SyBE_Sc02050001- SyBE_Sc02050030。随后选取柚皮素产量最高的 SyBE_Sc02050003 的 4 种基因模块组合用 *Not* I 酶切纯化后与 Module1 和 Module14 用醋酸锂转化法利用 Delta 位点整合至酿酒酵母 CENpK2-1D 基因组，提高柚皮素生产菌的稳定性，如图 2(c)。用 SC-ura 培养基筛选存菌，该菌株命名为 SyBE_Sc02050031。然后以 SyBE_Sc02050031 作为底盘菌株，将 Module16 质粒用醋酸锂转化法转化至酵母体内，在 SC-leu 平板上 30℃恒温倒置培养 2～3 d 后，在 SC-leu 固体培养基上划线分纯，至长出单菌落，挑取单菌落到 SC-leu 液体培养基，30℃、200 rpm 培养至 OD_{600} 约为 4，存甘油菌。该菌株命名为 SyBE_Sc02050032。菌株信息详见表 1。

本研究中，合成柚皮素生产菌的外源基因有 *TAL*，*4CL*，*CHS* 和 *CHI*，其中 *TAL* 的来源为圆红冬孢酵母（*R.toruloides*）；*4CL* 的来源为欧芹（*Petroselinum crispum*）；*CHI* 有 6 种来源包括大豆（*Glycine max*）、橙子（*Citrus sinensis*）、蜜柑（*Citrus unshiu*）、拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、玉米（*Zea mays*）、花生（*Arachis hypogaea*）；*CHS* 有 5 种来源包括拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、葡萄（*Vitis vinifera*）、虎杖（*Polygonum cuspidatum*）、海洋细菌（*Rhodopirellula baltica*）、

大豆（*Glycine max*）。用于合成8DN的异戊烯基转移酶N8DT来源于苦参（*Sophora flavescens*）。上述基因按照酿酒酵母密码子偏好性进行优化并规避常用酶切位点，并在两端添加 *Bsa* I 酶切位点后交由金斯瑞公司合成。合成后的基因质粒与相应模块用 *Bsa* I 酶切，获得基因片段，纯化回收后经 T4 连接酶连接，得到相应的基因表达载体。

表 1 实验中涉及的酵母菌株

Table 1 Yeast strains involved in this study

Strains	Chassis	Description	Source
CENpK2-1d	-	*MATa*，*his3Δ1*， *leu2Δ0*，*trp3Δ0*，*ura3Δ0*	purchased
SyBE_Sc02050001-SyBE_Sc02050030	CENpK2-1d	pRS415: T_{GPM1}-P_{PGIK}-*TAL*-T_{GPD1} pRS423: T_{GPD1}-P_{PGI1}-*4CL*-T_{FBA1} pRS414: T_{FBA1}-*CHS*-P_{TPI1}-T_{PGK1} pRS416: T_{PGK1}- P_{HXT7}-*CHI*-T_{CYC1}	This study
SyBE_Sc02050031	CENpK2-1d	*Delta::ura3*_P_{PGK1}-*TAL*-T_{GPD1}-P_{PGI3}-*4CL*-T_{FBA1}-P_{TPI1}-*CHS*-T_{PGK1}-P_{HXT7}-*CHI*-T_{CYC1}	This study
SyBE_Sc02050032	SyBE_Sc02050031	pRS425K-P_{ENO2}-Sf_*N8DT*-T_{GPM1}	This study
SyBE_Sc02050033	SyBE_Sc02050031	pRS425K-P_{ENO2}- Sf_*N8DTjie1-40*- T_{GPM1}	This study
SyBE_Sc02050034	SyBE_Sc02050031	pRS425K-P_{ENO2}- Sf_*N8DTjie1-84*- T_{GPM1}	

表 2 实验中涉及的质粒

Table 2 Plasmids involved in this study

Plamids	Description	Source
pRS425K	replace AmpKX with KanMX in pRS425	This lab
pRS415	single copy plasmid with *LEU2* and *Amp* marker	Purchased
pRS423	multi-copy plasmid with *LEU2* and *Amp* marker	Purchased
pRS414	single copy plasmid with *LEU2* and *Amp* marker	Purchased
pRS416	single copy plasmid with *LEU2* and *Amp* marker	Purchased
Module1	pRS425K: *delta1-URA3*-T_{GPM}	This study
Module2	pRS425K: T_{GPM1}-P_{PGIK} -T_{GPD1}	This study
Module3	pRS425K: T_{GPM1}-P_{PGIK}-*TAL*-T_{GPD1}	This study
Module4	pRS415: T_{GPM1}-P_{PGIK}-*TAL*-T_{GPD1}	This study
Module5	pRS425K: T_{GPD1}-P_{PGI1}-T_{FBA1}	This study
Module6	pRS425K: T_{GPD1}-P_{PGI1}-*4CL*-T_{FBA1}	This study
Module7	pRS423: T_{GPD1}-P_{PGI1}-*4CL*-T_{FBA1}	This study
Module8	pRS425K: T_{FBA1}-P_{TPI1}-T_{PGK1}	This study
Module9	pRS425K: T_{FBA1}-*CHS*-P_{TPI1}-T_{PGK1}	This study
Module10	pRS414: T_{FBA1}-*CHS*-P_{TPI1}-T_{PGK1}	This study

Module11	pRS425K: T_{PGK1}- P_{HXT7}-T_{CYC1}	This study
Module12	pRS425K: T_{PGK1}- P_{HXT7}-*CHI*-T_{CYC1}	This study
Module13	pRS416: T_{PGK1}- P_{HXT7}-*CHI*-T_{CYC1}	This study
Module14	pRS425K: T_{PGK1}-*delta2*	This study
Module15	pRS425K: T_{ENO2}-P_{PDC1}-T_{GPM1}	This study
Module16	pRS425K: T_{ENO2}-P_{PDC1}- Sf_*N8DT*-T_{GPM1}	This study
Module17	pRS425K: T_{ENO2}-P_{PDC1}- Sf_*N8DTjie1-40*-T_{GPM1}	This study
Module18	pRS425K: T_{ENO2}-P_{PDC1}- Sf_*N8DTjie1-84*-T_{GPM1}	This study

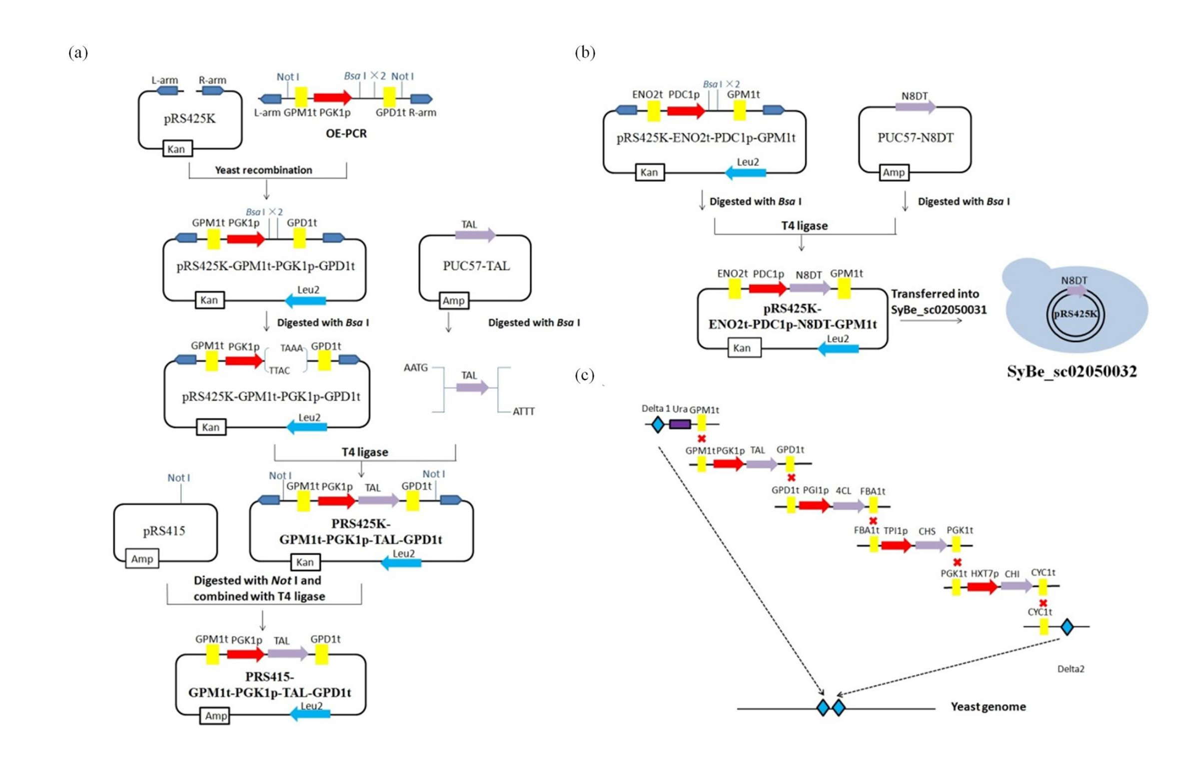


图 2 柚皮素及 8DN 生产菌的构建策略。(a) 柚皮素外源基因模块的构建(以 *TAL* 基因为例)。 (b) *N8DT* 基因模块的构建和导入。(c) Delta 位点整合基因模块示意图。

Fig.2 The construction strategy of the strains produced naringenin and 8DN. (a) Construction of the exgenous genes modules for synthesis of naringenin (for example *TAL*). (b) Construction and transformation of *N8DT* gene module for 8DN production. (c) Schematic diagram of integrating naringenin genes into the chromosome by Delta integration.

1.4 蛋白截断的设计和构建

通过在线工具 http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/对 N8DT 蛋白序列进行分析分析，考察蛋白的定位区域和 disorder 区域，通过该区域的截断策略改善蛋白的异源表达优化。以已有 PUC57-Sf_*N8DT* 为模板，通过两组特异性引物（见表 3）PCR 扩增得到 N 端截断后的 *N8DT* 基因，命名为 Sf_*N8DTjie1-40* 和

Sf_*N8DTjie1-84*，并与 Module15 质粒经过酶切连接后得到模块 Module17 和 Module18（见表 2）。将两个模块采用醋酸锂转化法分别导入 SyBE_Sc02050031 菌株中，经筛选分纯后，存甘油菌，命名为 SyBE_Sc02050033、SyBE_Sc02050034。

表 3 N8DT 基因截断的特异性引物序列

Table 3 Primers of truncated N8DT in this study

Primers name	Sequence
N8DTjie1-40-F	GGTCTCCATGGTACAAAAAGAGAAAGATCCAA
N8DTjie1-40-R	GGTCTCCTTTATCTGAATAAAGG
N8DTjie1-84-F	GGTCTCCAGTTGTCAATGCTATTTCCGAA
N8DTjie1-84-R	GGTCTCCTTTATCTGAATAAAGG

1.5 人工酵母菌株发酵

柚皮素筛选菌株的发酵：将SyBE_Sc02050001- SyBE_02050030菌株接种于3mL种子培养基中，在30℃、220rpm培养24h，以初始菌体浓度OD_{600}=0.2转接于新鲜的3mL种子培养基中，于30℃、220rpm条件下培养12h，以初始菌体浓度OD_{600}=0.1分别接种于50mLSC四缺培养基（20 g/L葡萄糖；6.7g/LYNB；2 g/Ldrop-out的氨基酸混合物；固体培养基添加2% 琼脂粉）中。培养条件为220rpm，30℃，培养96h，发酵结束时测定菌株浓度OD_{600}。

柚皮素整合菌株的发酵：SyBE_Sc02050031菌株的培养条件与上述菌株相同，发酵培养基选择YPD 培养基(40g/L 葡萄糖；20 g/L胰蛋白胨；10 g/L 酵母提取物；固体培养基添加2%琼脂粉）。

8DN生产菌株的发酵：SyBE_Sc02050032、SyBE_Sc02050033和SyBE_Sc02050034菌株的培养条件与上述菌株相同，发酵培养基选取50mLSc-leu（20 g/L葡萄糖；6.7g/L YNB；2 g/L drop-out去除异亮氨酸的氨基酸混合物；0.5g/L 酪氨酸)。

1.6 柚皮素与8二甲基异戊烯基柚皮素的提取和检测

柚皮素与8二甲基异戊烯基柚皮素的提取：取600μL发酵液，加入等体积的乙酸乙酯和石英砂，置于涡旋振荡器上5000rpm震荡30min后，以10000rpm的速度离心10min，用枪头吸出上清液放置在干净的EP管中，重复3次。将收集好的上清液进行氮吹蒸发，大约20min后确认无液体残留停止，获得浅黄色固体。加

入600μL色谱甲醇溶解，用2μm有机滤膜过滤后，装入进样小瓶中。

柚皮素与8二甲基异戊烯基柚皮素的检测采用HPLC (Waters2489 UV/Vis Detector, Waters Corp.，USA)测定，色谱柱为Ascentis Express C18(10cm× 2.1 mm, 2.7μm,Thermo)，流动相为甲醇和0.1%甲酸，比例随时间梯度变化。流速为0.2 mL/min，检测波长290/310nm，柱温30℃，进样量10 μL。

2. 结果与分析

2.1 生产8二甲基异戊烯基柚皮素酿酒酵母的构建

在菌株构建中合成的模块都通过*Not* I酶切验证了正确性，如图3(a)。其中(1)-(4)分别为柚皮素合成模块pRS425K-*TAL*，pRS423-*4CL*，pRS416-*CHI*和pRS414-*CHS*质粒的酶切凝胶电泳，在此每个外源基因都提供一种来源作为代表，其他数据未显示。(5)为8DN合成模块pRS425K-Sf_*N8DT*质粒的酶切凝胶电泳。

对生产8二甲基异戊烯基柚皮素的人工酿酒酵母构建分为两部分，一是体内合成柚皮素路径的构建，二是异戊烯基转移酶基因*N8DT*的表达。其中柚皮素作为重要的前体物质[27]，其体内合成各个模块的适配性是我们关注的重点，通过对不同来源的功能模块进行组合，最终我们得到了合成柚皮素的最适基因组合，并将它们通过Delta位点整合到酵母基因组上得到了高产柚皮素的稳定菌株SyBE_Sc02050031，该底盘菌不仅为后面的合成提供了前体物质柚皮素，同时为反应提供了适合的胞内环境，避免了饲喂柚皮素过程中底物利用率低，以及胞外高浓度柚皮素对该步反应的抑制等问题。

另一方面，为了最大限度提高*N8DT*基因的表达强度，我们选择将该基因连入pRS425K这一多拷贝质粒中[28,29]，以此增加其表达量，将该质粒导入柚皮素生产菌SyBE_Sc02050031中，实现8DN在酿酒酵母中的合成。

2.2 柚皮素和8二甲基异戊烯基柚皮素生产菌的摇瓶发酵定量和筛选

柚皮素与8DN的检测与定量是通过使用高效液相色谱（HPLC）在一定测定条件下，测量出生产菌中目标产物的保留时间和峰面积，并与各自标准品进行比对，如图3(b)。通过检测得到柚皮素与8DN的保留时间分别为8.32min和12.00min，它们的标准曲线为y=1388.6x-499.87 和 y=25196x+979.46。

经过不同来源的基因模块相互组合得到的30株柚皮素生产菌经过96h摇瓶发酵后，测定柚皮素产量如图3(c)所示，产量从0.36 mg/L到22.33 mg/L动态分布，差异近62倍，其中SyBE_Sc02050003的摇瓶发酵产量最高，达到22.33 mg/L。将基因组合优化构建的稳定的柚皮素生产菌SyBE_Sc02050031作为底盘细胞，导入Module 16质粒后得到8DN生产菌，8DN产量达到36.7 μg/L，如图3(d)。

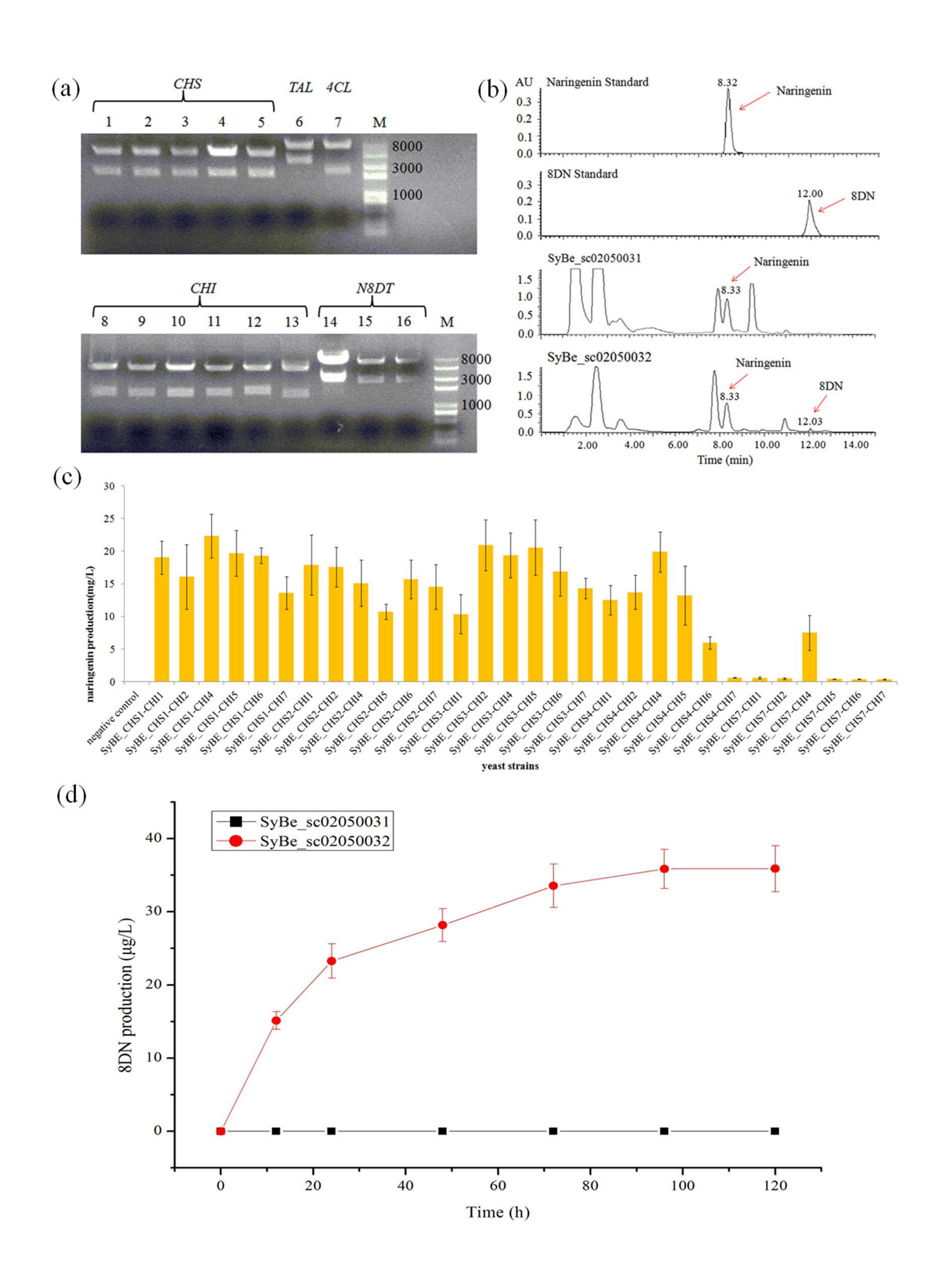


图 3 柚皮素和 8DN 生产菌构建和发酵验证。(a) 基因重组质粒经 *Not* I 单酶切鉴定电泳图，其中标号 1-5 为五种不同基因来源的 pRS414-*CHS* 重组质粒，对应来源分别是拟南芥、葡萄、虎杖、海洋细菌、大豆；标号 6 为圆红冬孢酵母来源的 pRS425K-*TAL* 重组质粒；标号 7 为欧芹来源的 pRS423-*4CL* 重组质粒；标号 8-13 为六种不同基因来源的 pRS416-*CHI* 重组质粒，对应来源分别是大豆、橙子、蜜柑、拟南芥、玉米、花生；标号 14-16 为苦参来源的 pRS425K-*N8DT* 重组质粒，其中 15,16 分别是两种截断蛋白 pRS425K-*N8DTjie1-40*，pRS425K-*N8DTjie1-84* 的重组质粒。

(b) 柚皮素，8DN 标准品及整合后的柚皮素生产菌 SyBe_sc02050031，8DN 生产菌 SyBe_sc02050032 的酵母提取液的 HPLC 图谱。(c) 摇瓶发酵筛选高产柚皮素人工酵母。(d) SyBe_sc02050031 与 SyBe_sc02050032 菌株摇瓶发酵 8DN 产量。

Fig.3 The construction and the detected results of the strains producing naringenin and 8DN. (a) The agarose gel electrophoresis identification of the genes by the restriction enzyme of *Not* I in this study. pRS414-*CHS* were indicated with Line 1-5 and the sources of *CHS* were *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, *Polygonum cuspidatum*, *Rhodopirellula baltica* and *Glycine max*, respectively; pRS425K-*TAL*from *R.toruloides* was indicated with Line 6; pRS423-*4CL*from *Petroselinum crispum* was indicated with Line 7; pRS416-*CHI* were indicated with Line 8-13 and the sources of *CHI* were *Glycine max*, *Citrus sinensis*, *Citrus unshiu*, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* and *Arachis hypogaea*, respectively; wild type pRS425K-*N8DT* from *Sophora flavescens* was indicated with Line 14,and the two truncated *N8DT*, pRS425K-*N8DTjie1-40* and pRS425K-*N8DTjie1-84*, were indicated with Line 15 and 16. (b) HPLC chrotomagraphy of the standard products of naringenin and 8DN, in addition of the yeast extracting solution of SyBe_sc02050031 and SyBe_sc02050032. (c) Naringenin production in shake flask. (d) 8DN production of SyBe_sc02050031 and SyBe_sc02050032 in shake flask.

2.3 *N8DT*基因优化对8DN产量的提高

根据相关调研和Yazaki等进行的柚皮素饲喂实验结果可知，在保证足量柚皮素供应的条件下，柚皮素的转化率仅为1.9%，这说明大部分柚皮素并没有被N8DT酶催化生成8DN，由于该酶的低催化活性使得增加柚皮素的前体供应并不能很好的提高终产物产量。而通过对*N8DT*基因进行优化改造，改善其活性，有望大幅提高8二甲基异戊烯基柚皮素的产量。

我们对N8DT蛋白的二级结构进行了预测（图4（a）），结果显示：1. 野生型的N8DT酶的N端1-40位氨基酸是信号肽序列。结合相关调研，我们发现该蛋白的信号肽在植物体内定位在叶绿体膜上，而本研究中的底盘酿酒酵母中无叶绿体，所以将会产生错误定位，甚至影响异源蛋白N8DT的正确表达折叠，另外N8DT的作用底物柚皮素主要存在于细胞质内，在酵母细胞中异源表达带有固有信号肽的N8DT可能不利于将柚皮素转化为8DN。2. 野生型的N8DT酶的N端存在冗长的不稳定结构序列（红框所示的disordered氨基酸序列），另外考虑到85-86位氨基酸Val和Asn折叠成的稳定的sheet结构，所以截断N端前段明显的不稳定结构序列（1-84位氨基酸）可能有助于改善N8DT在异源表达体系中的折叠稳定性。根据

以上的结果分析：我们设计了两种序列截断方案，一是敲除第1-40位氨基酸对应的信号肽序列，二是敲除第1-84位氨基酸对应的结构不稳定序列。为了进一步验证设计方案的可靠性，我们对1-40位氨基酸和1-84位氨基酸两种截断后的N8DT变异体序列进行了二级结构预测。如图4（b）所示，N8DT蛋白N端1-40位氨基酸截断后的二级结构预测结果显示，未检测到定位的信号肽结构，说明该截断方案初步达到了设计效果。另外如图4（c）所示，N8DT蛋白N端1-84位氨基酸截断后的二级结构预测结果显示，N8DT蛋白N端冗长的不稳定序列结构被明显去除，这可能对蛋白在异源表达体系中的稳定折叠有利，因此我们也初步确立了该方案进行后续的研究。

我们设计的第一种优化策略是截断N8DT的N端信号肽序列，即1-40位氨基酸序列（图4（a）和（b）），希望优化N8DT在酵母中的定位和表达，以此达到提高该步转化效率的目的。通过终产物8DN的产量变化对N8DT的N端信号肽截断策略进行了验证，结果显示，载入N端信号肽截断的*N8DT*（N8DTjie1-40）表达质粒的8DN生产菌SyBe_sc02050033，经摇瓶发酵，8DN的产量提高到52.6μg/L，与载入野生型*N8DT*表达质粒的生产菌SyBe_sc02050032的8DN产量相比，提高了44.2%（图5）。第二种优化策略根据蛋白二级结构预测的稳定性分析，截断了N8DT蛋白N端不稳定的1-84位氨基酸序列（N8DTjie1-84）（图4（a）和（c））。与最初的8DN生产菌株SyBe_sc02050032的8DN产量相比，包含N8DTjie1-84表达质粒的8DN生产菌SyBe_sc02050034的8DN产量提高了19.1%，达到43.5μg/L（图5）。

以上结果表明，两种N8DT的N端序列截断方案均起到了一定的优化效果，在不同程度上提高了该步催化反应的效率，达到了我们的预期目的，并且8DN的产量对比说明在酿酒酵母中N8DT酶的N端信号肽关联的定位结构是影响该酶活性的关键因素。对于N8DT酶的结构改造与功能的进一步深入分析，包括酶活力考察等工作，将是我们未来的一个研究工作重点。

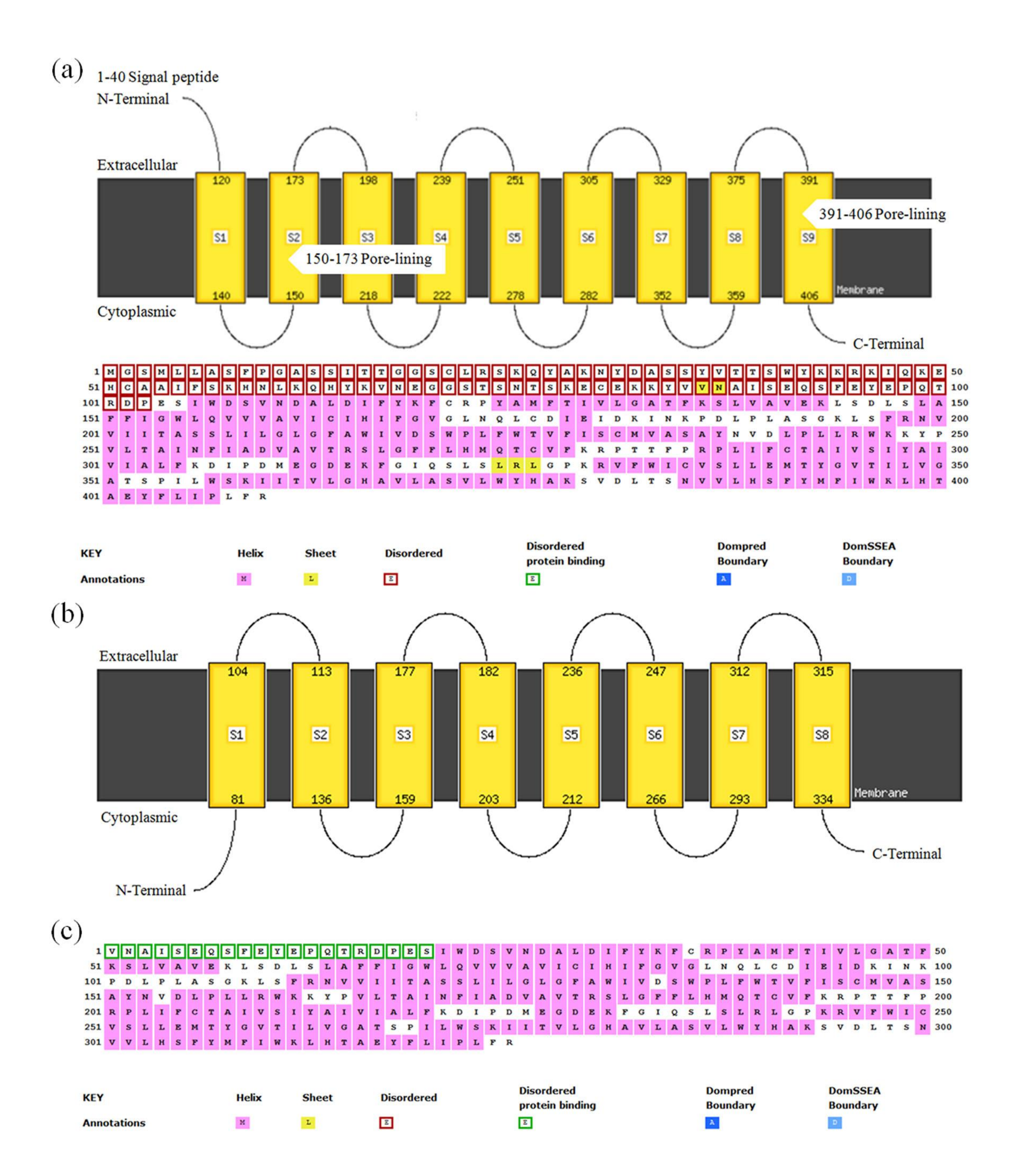


图 4 N8DT 蛋白的二级结构预测和分析。(a) 野生型 N8DT 蛋白的定位结构信号肽预测和结构稳定性分析。(b) 1-40 位氨基酸截断后的 N8DT 蛋白的定位结构预测。(c) 1-84 位氨基酸截断后的 N8DT 蛋白的结构稳定性分析。

Fig.4 The forecast and analysis of the secondary structure of N8DT. (a) The prediction of the signal peptide for sublocalization and strutural stability of N8DT. (b) The prediction of structural information for sublocalization of the N-terminal truncated N8DT at Ser40. (c) The analysis of the structural stability of the N-terminal truncated N8DT at Val84.

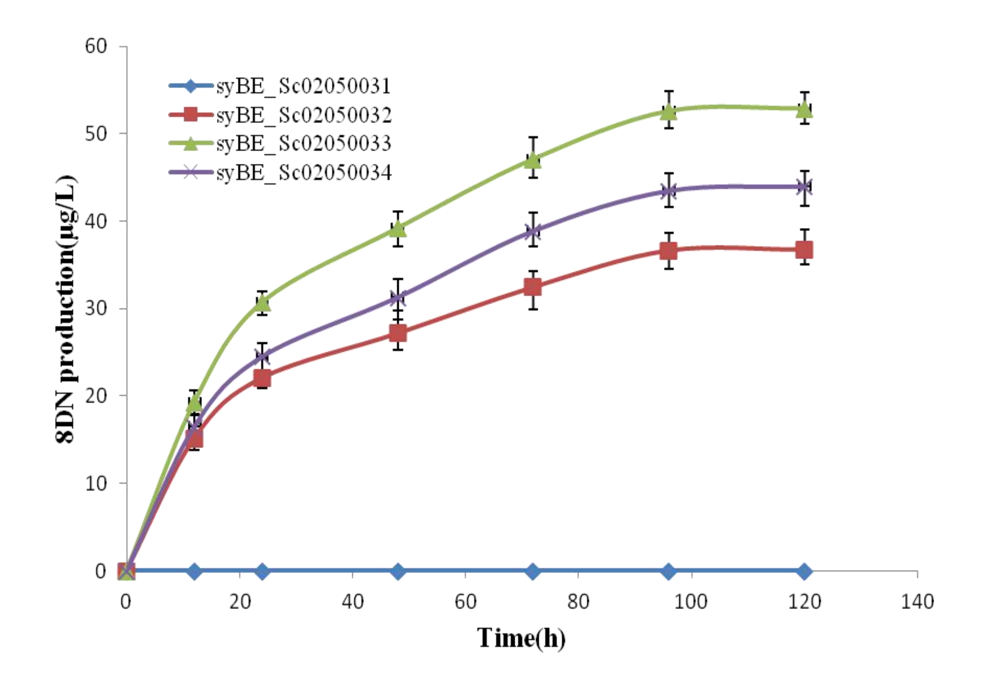


图 5 N8DT 蛋白 N 端截断后的摇瓶发酵验证。

Fig.5 8-dimenthylally naringenin production in shake flask after protein truncated test.

3. 结论

本研究首先将不同来源的外源基因模块进行组合筛选，利用Delta位点将其整合至酵母基因组上，克服了多拷贝质粒容易丢失的问题，获得高产柚皮素的稳定的底盘菌。在底盘菌中进一步引入8DN的关键合成酶N8DT，并确认N8DT酶的低催化活性是重要限速步骤，然后基于蛋白二级结构分析提出了两种酶的序列优化截断策略：定位信号肽区域（1-40AA）和 disorder区域（1-84AA），都取得了正向效果，促使8DN的产量从36.7μg/L分别提高到52.6 μg/L (144.2%)和43.5 μg/L (119.1%)。该研究通过关键外源基因的优化组合和关键酶的N端结构截断策略首次获得了高产8DN的在酿酒酵母菌株，对其他黄酮类天然产物的微生物合成体系构建具有重要的参照价值和借鉴意义。

参考文献

[1] Yan YJ, Kohli A, Koffas M A. Biosynthesis of natural flavanones in Saccharomyces cerevisiae. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 5610-5613.

[2] Chtourou Y, Aouey B, *et al*. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of naringin on cisplatin-induced renal injury in the rat. Chemico-biological interactions, 2016, 243:1-9.

[3] Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry, 2000, 55: 481–504.

[4] Maitrejean M, Comte G, Barron D, *et al*. The flavanolignan silybin and its hemisynthetic derivatives, a novel series of potential modulators of glycoprotein. Bioorg. Med. Chem. Lett, 2000, 10: 157–160.

[5] Sasaki K, Tsurumaru Y, Yazaki K. Prenylation of Flavonoids by Biotransformation of Yeast Expressing Plant Membrane-Bound Prenyltransferase SfN8DT-1. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2009, 73 (3): 759–761.

[6] Wu J, Du G, *et al*. Enhancing flavonoid production by systematically tuning the central metabolic pathways based on a CRISPR interference system in *Escherichia coli*. Scientific Reports, 2015, 5:13477.

[7] Zhang G, Liu S, Tan W, *et al*. Synthesis and biological evaluations of chalcones, flavones and chromenes as farnesoid x receptor (FXR) antagonists. Eur J Med Chem, 2017, 129(3): 303-309.

[8] 李毅林，一种天然产物淫羊藿苷类化合物的全合成方法，中国专利, 200610165354. 2008-06-25.

Li YL, A method of total synthesis for the natural product Icariin compound. Chinese patent, 200610165354. 2008-06-25.

[9] Geissman TA, David KF. Flavonones and related compounds. V. the oxidation of 2’-hydroqchalcones with alkaline hydrogen peroxide. J. Am, Chem, Soc, 1948, 50(5): 1686-1689.

[10] Aurangzeb H, Sadipa A, Abbasa A, *et al*. Isolation and synthesis of flavonols and comparison of their antioxidant activity. Natural Product Research, 2010, 24: 995-1003.

[11] Fu ML, Wang W, Chen F, *et al*. Production of 8-Phrenylnaringenin from isoxanthohumol through biotransformation by fungi cells. J. Agric. Food Chem, 2011, 59: 7419-7426.

[12] Sasaki K, Tsurumaru Y, Yazaki K, *et al*. Molecular Characterization of a Membrane-bound Prenyltransferase Specific for Isoflavone from *Sophora flavescens*. The Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(8): 24125-24134.

[13] 傅明亮，刘婧，陈苗苗，等. RP-HPLC 法同步检测酒花中黄腐酚、异黄腐酚与 8 异戊烯基柚皮素. 中国食品学报, 2010, 6: 193-198.

Fu ML, Liu J, Chen MM, et al. Synchronous detected xanthohumol, isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin in *Humulus lupulus* by RP-HPLC. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2010, 6: 193-198.

[14] Vickers CE, Bongers M, Liu Q, *et al*. Metabolic engineering of volatile isoprenoids in plants and microbes. Plant, Cell & Environment, 2014, 37(8): 1753-1775.

[15] Fowler ZL, Koffas MA. Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 83: 799–808.

[16] Wang Y, Chen S, Yu O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 91: 949–956.

[17] Limem I, Guedonc E, Hehn A, *et al*. Production of phenylpropanoid compounds by recombinant microorganisms expressing plant-specific biosynthesis genes. Process Biochem, 2008, 43:

463–479.

[18] Wilhelm H, Wessjohann LA. An efficient synthesis of the phytoestrogen 8-prenylnaringenin from xanthohumol by a novel demethylation process. Tetrahedron, 2006, 62: 6961-6966.

[19] MacDonald IC, Deans TL. Tools and applications in synthetic biology. Adv Drug Deliv Rev, 2016, 105(A): 20-34.

[20] Gibson DG, Venter JC. Construction of a yeast chromosome. Nature, 2014, 509(5): 168-169.

[21] Sun J, Shao Z, Zhao H, *et al*. Cloning and characterization of a panel of constitutive promoters for applications in pathway engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Bioeng, 2012, 109(8): 2082-2092.

[22] Fink G, Farabaugh P, Roeder G, *et al*. Transposable elements (Ty) in yeast. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1981, 45(2): 575-580.

[23] Siddiqui M S, Thodey K, Trenchard I, *et al*. Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools. Fems Yeast Res, 2012, 12(2): 144-170.

[24] Jiang HX, Karl V, John A. Metabolic Engineering of the Phenylpropanoid Pathway in *Saccharomyces cerevisiae.* Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(6): 2962-2969.

[25]. Lee F W, Da S N. Sequential delta-integration for the regulated insertion of cloned genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Prog, 1997, 13(4): 368-373.

[26] Sasaki K, Tsurumaru Y, Yazaki K. *et.al*. Cloning and Characterization of Naringenin 8-Prenyltransferase, a Flavonoid-Specific Prenyltransferase of Sophora flavescens. Plant Physiology, 2008, 146(3): 1075-1084.

[27] Sasaki K, Tsurumaru Y, *et.al*. Metabolic engineering for the production of prenylated polyphenols transgenic legume plants using bacterial and plant prenyltransferases. Metabolic Engineering, 2011, 13(7): 629-637.

[28] Kim IK, Roldao A, Siewers V, *et al*. A systems-level approach for metabolic engineering of yeast cell factories. Fems Yeast Res, 2012, 12: 228-248.

[29] Shao Z, Zhao H, Zhao H. DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways. Nucleic Acids Res, 2008, 37(2): e16.